PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

DE

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶:

A61K 47/48, 9/00

A2 (4)

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/17317

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

30. April 1998 (30.04.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/05790

(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Oktober 1997 (21.10.97)

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, MX, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

196 43 738.5

23. Oktober 1996 (23.10.96)

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SKW TROSTBERG AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Dr.-Albert-Frank-Strasse 32, D-83308 Trostberg (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BAYER, Ernst [DE/DE]; Bei der Ochsenweide 17, D-72076 Tübingen (DE). FRITZ, Hans [DE/DE]; Ludwigstrasse 12, D-72072 Tübingen (DE). MAIER, Martin [DE/DE]; Mohlstrasse 60, D-72074 Tübingen (DE).
- (74) Anwälte: HANSEN, Bernd usw.; Hoffmann . Eitle, Arabellastrasse 4, D-81925 München (DE).
- (54) Title: PROCESS FOR PRODUCING BIOLOGICALLY ACTIVE POLYMER NANOPARTICLE-NUCLEIC ACID CONJUGATES
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOLOGISCH AKTIVEN POLYMERNANOPAR-TIKEL-NUCLEINSÄURE-KONJUGATEN

(57) Abstract

A process is disclosed for producing biologically active polymer nanoparticle—nucleic acid conjugates by polymerising vinyl monomers with a low water solubility in an aqueous solution, then reacting the resulting polymer suspensions with the nucleic acids. The process is characterised in that the vinyl monomers are emulsion polymerised in the presence of cationic radical starters but in the absence of any emulsifier. The thus obtained polymer nanoparticle—nucleic acid conjugates are sufficiently stable in biological media and are characterised by a high transport efficiency through cellular membranes.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Herstellung von biologisch aktiven Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugaten durch Polymerisation von vinylischen Monomeren mit einer geringen Wasserlöslichkeit in wäßriger Lösung und anschließender Umsetzung der entstehenden Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren beschrieben, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Polymerisation der vinylischen Monomeren in Gegenwart von kationischen Radikalstartern und in Form einer emulgatorfreien Emulsionspolymerisation durchführt. Die auf diese Weise hergestellten Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate weisen eine ausreichende Stabilität in biologischen Medien auf und zeichnen sich durch eine hohe Effizienz beim Transport durch zelluläre Membranen aus.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

4.7	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AL	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AM	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AT	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AU	Austranen Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
AZ		GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BA	Bosnien-Herzegowina Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BB		GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BE	Belgien	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BF	Burkina Faso	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BG	Bulgarien	IE.	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BJ	Benin		Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BR	Brasilien	IL V	Israei Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
BY	Belarus	IS		MX	Mexiko	00	Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	ĴΡ	Japan	NL NL	Niger Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO NO		YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan		Norwegen	zw	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zunozowe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Herstellung von biologisch aktiven Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugaten

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur

10 Herstellung von biologisch aktiven PolymernanopartikelNucleinsäure-Konjugaten und deren Verwendung zum Gentransfer
bzw. zur Kontrolle der Genexpression.

Die Verwendung von Nucleinsäuren und Nucleinsäure-Derivaten,
wie z.B. von synthetisch hergestellten Oligodesoxynucleotiden
und deren Derivaten zur Steuerung der Genexpression
(Antisense-Strategie) oder von DNA-Fragmenten und Plasmiden
zum Gentransfer, machen einen wirksamen Transport durch
zelluläre Membranen erforderlich. Des weiteren sollten die
Nucleinsäuren gegen enzymatischen Abbau geschützt sein und in
ausreichender Konzentration ihren Zielort in der Zelle
(Zellkern, mRNA im Zytoplasma) erreichen, um die gewünschte
Wirkung zu gewährleisten.

- Kolloidale Trägersysteme werden seit langem für den Transport von biologisch bzw. therapeutisch wirksamen Substanzen verwendet, wobei an das Trägersystem folgende Anforderungen gestellt werden:
 - kleine Partikelgröße, die deutlich unterhalb der Größe von Zellstrukturen (Durchmesser kleiner als 1 μ m) liegt
 - hohe Beladungskapazität
 - niedrige Toxizität

5

30

- Möglichkeit zur Oberflächenmodifizierung
- Steuerung des Zielortes durch Variation von Größe bzw. Oberflächeneigenschaften
- kontrollierte Freisetzung der adsorptiv gebundenen Substanzen

. 2

- keine Nebenwirkungen durch Trägermaterial, Abbauprodukte oder Hilfsstoffe

Der Einsatz von synthetisch hergestellten Polymerpartikeln im nm-Bereich zur adsorptiven Anbindung von Nucleinsäuren ist bspw. in der FR-A 2,649,321 beschrieben. Hierbei werden Poly(alkylcyanoacrylate) durch die adsorptive Anbindung von niedermolekularen, hydrophoben Kationen mit einer positiven Oberflächenladung versehen, um eine Anlagerung von negativ geladenen Oligodesoxyribonucleotiden über ionische 10 Wechselwirkungen zu ermöglichen. Nachteilig bei diesem System ist die Tatsache, daß die rein adsorptive Bindung niedermolekularer Kationen wenig stabil ist und sowohl die verwendeten hydrophoben Kationen, als auch die Abbauprodukte des Polymergrundkörpers toxische Eigenschaften aufweisen 15 können.

Gemäß der EP-A 430 517 wird die Herstellung von Biomosaikpolymeren in Form von Membranen, Filmen oder Partikeln mittels Emulsionspolymerisation beschrieben, wobei die Polymerisation im wesentlichen in Gegenwart einer oberflächenaktiven Substanz (ionisches oder nichtionisches Tensid) sowie einer biologisch aktiven Substanz (wie z.B. Nucleinsäuren) erfolgt und das biologisch aktive Material irreversibel in den Polymergrundkörper einpolymerisiert bzw. an dessen Oberfläche gebunden wird.

20

25

Schließlich ist aus der WO 96/24 377 eine partikuläre Arzneiform bekannt, die aus kationischen Polymernanopartikeln und Peptiden bzw. modifizierten oder nichtmodifizierten 30 Nucleinsäuren bestehen. Als Polymergrundkörper fungieren hierbei Partikelmischpolymere auf Basis von Acrylsäuren, Acrylsäureestern sowie Methacrylsäureestern. Die Einführung der zur Anbindung der Wirkstoffe erforderlichen funktionellen kationischen Gruppen erfolgt durch den Einsatz von 35 entsprechend modifizierten Comonomeren, die protonierbare bzw. alkylierbare Aminfunktionen besitzen. Diese

PCT/EP97/05790 WO 98/17317 3

ladungstragenden Monomerbausteine werden in beliebigen Mischungsverhältnissen mit dem entsprechend unmodifizierten Monomer in einer radikalischen oder ionischen Polymerisationsreaktion umgesetzt. Ganz abgesehen davon, daß diese Monomerbausteine aufwendig herzustellen sind, treten aufgrund der vorhandenen Unterschiede in der Löslichkeit und Reaktivität dieser Monomere bei der Herstellung dieser Mischpolymere häufig inhomogene Produkte auf.

Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, 10 ein Verfahren zur Herstellung von Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugaten zu entwickeln, welches die genannten Nachteile entsprechend dem Stand der Technik nicht aufweist, sondern in einfacher, kostengünstiger und gut reproduzierbarer Weise die Herstellung homogener 15

Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate ermöglicht, die eine ausreichende Stabilität in biologischen Medien aufweisen und die sich durch eine hohe Effizienz beim Transport durch zelluläre Membranen auszeichnen.

20

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man eine Polymerisation von vinylischen Monomeren mit einer geringen Wasserlöslichkeit in Gegenwart von kationischen Radikalstartern in Form einer emulgatorfreien Emulsionspolymerisation durchführt und anschließend die

entstehenden Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren umsetzt.

Es hat sich nämlich überraschenderweise gezeigt, daß die so erzeugten Materialien sich durch eine hohe Nucleinsäure-30 Beladung sowie durch eine ausreichende Stabilität gegen enzymatischen Abbau auszeichnen. Außerdem können diese Konjugate durch viele Parameter in ihren Eigenschaften variiert werden, wie z. B. Polymergrundkörper, Partikelgröße, Oberflächenmodifizierung, Nucleinsäuremodifizierung etc., was 35 ebenfalls nicht vorhersehbar war. Von den Konjugaten gemäß der WO 96/24 377 sind die erfindungsgemäßen Konjugate dadurch

verschieden, daß sie kationische Gruppen praktisch ausschließlich an den Kettenenden der jeweiligen Polymerketten, aus denen das Polymer-Nanopartikel besteht, enthalten, nicht aber im Inneren der Polymerkette.

5

Das Verfahren entsprechend der vorliegenden Erfindung umfaßt also in der Regel zwei Stufen. In der ersten Stufe erfolgt die Herstellung des Polymergrundkörpers in an sich bekannter Weise, indem man vinylische Monomere in wäßrigem

Dispersionsmedium einer emulgatorfreien
Emulsionspolymerisation unterwirft. Die vinylischen Monomere
sollten hierbei eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen, die
vorzugweise < 20 g/l betragen sollte. Beispiele für solche
vinylische Monomere sind Styrol, Acrylsäure- oder

Methacrylsäure- Derivate. Bevorzugte (Meth)acrylsäureDerivate sind Alkyl (meth)acrylate (mit einem Alkylrest von 1
bis 8 C-Atomen) sowie N-Alkyl- oder Dialkylacrylamide, wie z.
B. N-Butylmethylacrylamid, N-Isobutylmethylacrylamid oder NOctylmethylacrylamid.

20

25

Es ist als erfindungswesentlich anzusehen, daß die Emulsionspolymerisation, die vorzugsweise bei Temperaturen von 20 bis 100 °C durchgeführt wird, ohne den Zusatz von Emulgatoren erfolgt und daß die Oberflächenladung des Polymergrundkörpers allein durch die Verwendung ionischer Radikalstarter induziert wird. Hierbei haben sich vor allem kationische Initiatoren mit basischen Endgruppen, wie z. B. 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AIBA) oder 2,2'-Azobis(2-(2-imidazolin-2-yl)propan)dihydrochlorid (AIBI)

30 bewährt.

Aufgrund der Tatsache, daß keine zusätzlichen Fremdstoffe wie Emulgatoren oder Stabilisatoren dem Ansatz hinzugefügt werden, ist eine aufwendige Abtrennung dieser Stoffe in einem nachfolgenden Reinigungsschritt nicht erforderlich.

PCT/EP97/05790 WO 98/17317 5

Da in wäßrigem Dispersionsmedium gearbeitet wird, gestaltet sich der Herstellungsprozeß des polymeren Grundkörpers als besonders kostengünstig. Vorzugsweise wird der Polymerisationsschritt in Form eines Batch-Prozesses durchgeführt, dessen Up-Scaling keine Schwierigkeiten bereitet, da Schwankungen in der Temperaturführung sowie die gewählte Rührtechnik nur einen geringen Einfluß auf die Eigenschaften des Endproduktes haben. Je nach gewählter Monomer- und Initiatorkonzentration des Reaktionsansatzes weisen die Polymerteilchen nach der Emulsionspolymerisation eine Teilchengröße von vorzugsweise 10 bis 1000 nm und eine Oberflächenladung von 0,1 bis 10 C/g Polymer auf.

Die erhaltenen Polymersuspensionen sind auch bei Raumtemperatur über mehrere Monate lagerfähig, so daß irgendwelche Agglomerationen nicht zu beobachten sind. Die weiteren Vorteile dieser polymeren Trägermaterialien sind ihre hohe Stabilität in biologischen Medien und geringe Toxizität im gewünschten Anwendungsbereich.

20

25

15

10

Vor der Umsetzung der Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren werden gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sowohl die Polymersuspensionen als auch die Nucleinsäuren bspw. durch Zentrifugation oder Diafiltration aufgereinigt. Bei der bevorzugten Diafiltration kann auf die üblichen Dialyseverfahren und Membranen zurückgegriffen werden.

Darüber hinaus ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung noch möglich, daß man den Polymersuspensionen nach der Polymerisation Stabilisatoren in einer Menge von vorzugsweise 30 0,01 bis 5 Gew.-% bezogen auf das Gewicht der Suspension zusetzt, um auf diese Weise eine zusätzliche sterische Stabilisierung der Polymersuspension zu erreichen. Als Stabilisatoren werden hierzu vorzugsweise biologisch inerte, nicht-ionische Blockcopolymere mit hydrophoben und 35 hydrophilen Anteilen eingesetzt. Beispiele für solche Stabilisatoren sind Poloxamere oder Poloxamine.

30

Die eigentliche Umsetzung der Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren entsprechend der zweiten Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt vorzugsweise bei Temperaturen von 10 bis 30 °C und einem pH-Wert < 11, wobei allerdings die zur Anbindung verwendeten Nucleinsäuren in deprotonierter Form vorliegen sollten. Als Nucleinsäuren kommen hierbei bspw. Desoxyribonucleotide, Ribonucleotide oder chemisch modifizierte Desoxyribonucleotide und Ribonucleotide mit 7 bis 40 Nucleotideinheiten in Frage. Darüber hinaus können jedoch auch ohne weiteres Plasmide als Nucleinsäuren verwendet werden.

Die bei der Umsetzung entstehenden erfindungsgemäßen Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate, welche durch den 15 Nucleinsäureanteil eine gewisse negative Überschußladung aufweisen, können gemäß einer bevorzugten Ausführungsform in einer Art Sandwich-Komplex zusätzlich mit Peptiden, Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt > 7 oder Polyethylenimin modifiziert werden. Die Beladungskapazität des 20 Trägermaterials mit Nucleinsäure bzw. Peptiden oder Proteinen wird durch den Zusatz von sterischen Stabilisatoren nicht beeinflußt. Die effektiv gebundene Nucleinsäure- bzw. Peptidoder Proteinmenge kann durch Abzentrifugation der Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate und Messung der im 25 Überstand vorhandenen überschüssigen ungebundenen Substratmenge leicht bestimmt werden.

Die erfindungsgemäßen Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate eignen sich aufgrund ihrer biologischen Aktivität hervorragend zum Gentransfer sowie zur Kontrolle der Genexpression.

Als Testsystem zur Untersuchung der Effizienz der erfindungsgemäßen Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate dienten Rattenhepatozyten, deren Multiple Drug Resistance-(mdr-) Gen durch den Einsatz von Antisense Oligonucleotiden inhibiert werden sollte. Überraschenderweise kann die Konzentration an anti-mdr Phosphorthioat-Oligonucleotiden bei den Konjugaten im Vergleich zu den freien Oligonucleotiden um den Faktor 10 herabgesetzt werden, um die gleiche Wirkung zu erzielen. Noch deutlicher wird der Unterschied bei Verwendung von nucleaselabilen Phosphordiester-Oligonucleotiden, die nur im Falle der erfindungsgemäßen Konjugate überhaupt eine Wirkung zeigen, da sie in der Konjugatform vor enzymatischem Abbau geschützt sind. Aufgrund ihrer höheren Spezifität und Biokompatibilität stellen jedoch gerade die unmodifizierten, natürlichen DNA-Fragmente eine interessante Variante in der Antisense-Strategie dar.

5

10

Auch die erfindungsgemäßen Polymernanopartikel-Nucleinsäure- Konjugate in Form von Plasmiden eignen sich hervorragend zum Gentransfer. Zur Untersuchung der Beladungskapazität und Wirksamkeit zum Gentransfer wurden Plasmide, die β - Galactosidase-Gene als leicht nachweisbare Expressionskontrollen enthalten, eingesetzt. Die Beladungskapazität (in μ g DNA/mg Polymer) lag etwa um den Faktor 4 höher als bei kurzen Oligonucleotid-Fragmenten.

Die besonderen Vorteile der erfindungsgemäßen Polymernanopartikel- Nucleinsäure-Konjugate bestehen im wesentlichen darin, daß bei der Herstellung weder die 25 Verwendung von ionischen Comonomeren noch der Einsatz von hydrophoben Kationen als Ladungsträger erforderlich ist, da die negativ geladenen Nucleinsäuren direkt von den geladenen Endgruppen auf der Partikeloberfläche elektrostatisch gebunden werden. Nebenwirkungen in biologischen Systemen, 30 insbesondere bei Zellkulturexperimenten, die häufig bei Verwendung von biologisch abbaubaren Trägermaterialien oder adsorptiv gebundenen Hilfsstoffen auftreten, sind im vorliegenden Fall minimal, da außer den gebundenen Nucleinsäuren bzw. Peptiden keine biologisch wirksamen 35 Substanzen freigesetzt werden. Wie Bioverträglichkeitstests an Rattenhepatozyten zeigen, liegt die LDH-Ausschüttung als

Assay für die Zytotoxizität bspw. für Polystyrol bei Konzentrationen von 1 g Polymer/l Inkubationsmedium nach 20 Stunden nur um 5 % höher als bei der unbehandelten Kontrolle.

Die erfindungsgemäßen Polymernanopartikel-NucleinsäureKonjugate und deren Komplexe mit basischen Peptiden oder
Proteinen stellen somit ein neues und effizientes System zur
in vitro-Kontrolle der Genexpression (Antisense-Strategie)
dar. Ferner können sie in vielfältiger Weise als Vektoren zur
Gentransfektion eingesetzt werden. So lassen sich durch
Variation der Größe, Art und Oberflächenladung des polymeren
Nanopartikel-Grundkörpers durch Wahl der wirksamen
Nucleinsäure-Komponente und deren Derivatisierung sowie durch
die Modifikation der Oberfläche mittels basischer Peptide
oder Polyethylenimin die Polymernanopartikel-NucleinsäureSysteme auf die jeweiligen Anforderungen der biologischen
Testsysteme anpassen.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher veranschaulichen.

<u>Beispiele</u>

Beispiel 1

25

30

20

In einem 100 ml Rundkolben, versehen mit KPG-Rührer, Rückflußkühler, Argoneinlaß- und -auslaßvorrichtungen werden 40 ml Reinstwasser und 2,5 ml zuvor unter Schutzgas (Argon) frisch destilliertes Styrol gegeben und unter Durchleiten eines Argonstroms intensiv durchmischt. Dem Ansatz werden 50 mg 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AIBA), gelöst in 5 ml H₂O, zugefügt und das Reaktionsgefäß in ein auf 80 °C temperiertes Ölbad getaucht und bei einer Rührerdrehzahl von 360 U/Min. gerührt. Nach ca. 10 Min. ist eine milchig weiße Trübung des Reaktionsansatzes zu erkennen. Nach 24 Stunden wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Man erhält eine Polymersuspension mit einem Feststoffgehalt von 42 g/l und

einem Teilchendurchmesser von 400 bis 500 nm, die eine weitgehend monodisperse Größenverteilung der Partikel aufweist. Das Material wird über einen Zeitraum von 7 Tagen mittels einer Dialysemembran (SpectraPor; MWCO: 10000; Fa. Roth, Karlsruhe) gegen Reinstwasser dialysiert, um im Dispersionsmedium gelöstes Polymer und Restmonomerspuren zu entfernen. Das aufgereinigte Produkt weist einen Feststoffgehalt von 40 g/l und eine konduktometrisch bestimmte Partikelladung von 750 mC/g Polymer auf.

10

15

Nach der Phosphoramidit-Methode synthetisch hergestelltes Phosphorothioat-Oligodesoxynucleotid 20mer der Sequenz 5' CCC TGC TCC CCC CTG GCT CC 3' (ODN-1; M_W : 6207 g/mol) wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt und nach Abspaltung der Dimethoxytritylschutzgruppe mittels einer sterilen Dialysemembran (SpectraPor CE; MWCO: 500; Fa. Roth, Karlsruhe) gegen Reinstwasser über einen Zeitraum von 7 Tagen dialysiert.

20 200 μ l der Polymersuspension (8 mg Polymer) werden mit 100 ng (16 nmol) Phosphorothioat-Oligonucleotid (ODN-1), gelöst in Reinstwasser, über einen Zeitraum von 12 bis 24 Stunden inkubiert. Man erhält ein Polymernanopartikel-Oligonucleotid-Konjugat mit einem Nucleinsäureanteil von 1,7 μ mol

Oligonucleotid/g Polymer (10,6 mg Nucleinsäure/g Polymer).

Die Bestimmung der Beladungskapazität erfolgt nach dem nachfolgend beschriebenen Verfahren:

Nach der Inkubation der Nanopartikel mit der Nucleinsäure wird das Konjugat abzentrifugiert (14 000 g, 2 x 45 Min.) und die Menge an ungebundener Substanz im Überstand mittels UV-Messung bestimmt. Die adsorptiv gebundene Substanzmenge wird durch die Differenz zur Ausgangsmenge an Nucleinsäure bzw.

35 Peptid berechnet.

PCT/EP97/05790 WO 98/17317 10

Beispiel 2

Der Polymerisationsansatz und die Aufreinigung des Produktes erfolgt analog zu Beispiel 1. Dabei werden jedoch 1,5 ml Styrol eingesetzt. Man erhält eine Polymersuspension mit einem Feststoffgehalt von 23 g/l. Die Partikel weisen Teilchendurchmesser von 150 bis 400 nm auf. Nach der Dialyse liegt der Feststoffgehalt bei 22 g/l und die Partikelladung bei 1080 mC/g.

10

Nach Inkubation von 100 μ l der Polymersuspension (2,2 mg Polymer) mit 23,8 ng (5,3 nmol) Phosphordiester-Oligonucleotid 15mer der Sequenz 5' TTC TTG TCT GCT CTT 3' (ODN-2; M_W : 4491 g/mol) analog zu Beispiel 1 erhält man ein Polymernanopartikel-Oligonucleotid-Konjugat mit einem 15 Nucleinsäureanteil von 2,0 μmol Oligonucleotid/g Polymer (8,9 mg Nucleinsäure/g Polymer).

Beispiel 3 20

Analog zu Beispiel 1 wird zu 80 ml H2O und 3 ml Styrol eine Lösung von 118 mg 2,2'-Azobis(2-(2-imidazolin-2yl)propan)dihydrochlorid (AIBI) in 10 ml Wasser gegeben und bei 80°C über einen Zeitraum von 24 Stunden durchpolymerisiert. Die erhaltene Polymersuspension hat einen Feststoffgehalt von 23,9 g/l und besteht aus Partikeln mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 150 bis 200 nm, die eine weitgehend monodisperse Größenverteilung aufweist. Der Feststoffgehalt beträgt nach der Dialyse über einen Zeitraum 30 von 21 Tagen 22,7 g/l und die Partikelladung 930 mC/g. Da die mit AIBI hergestellten Polymerpartikel eine höhere Oberflächenladung und eine höhere Beladungskapazität aufweisen, bilden solche Partikel die besten Konjugate mit Nucleinsäuren und stellen daher nach gegenwärtigem Kenntnisstand der Erfinder die beste Ausführungsform der Erfindung dar.

Die Toxizität der Polymersuspension (stabilisiert mit einer wäßrigen Lösung von 0,1 % (w/v) Poloxamer 338 (Fa. ICI Chemicals; Manchester, UK); Dichte nach der Stabilisierung: 9,56 g/l) bei Rattenhepatozyten, bestimmt über die LDH-Ausschüttung, beträgt nach 20 Stunden 81 Einheiten im Gegensatz zu 77 Einheiten der unbehandelten Kontrolle (1 g Polymer/l Inkubationsmedium).

Nach Inkubation von 200 μl der stabilisierten Polymersuspension (4,5 mg Polymer) mit 72,7 ng (16,2 nmol) ODN-2 analog dem Verfahren zu Beispiel 1 erhält man ein Polymernanopartikel-Oligonucleotid-Konjugat mit einem Nucleinsäureanteil von 3,0 μmol Oligonucleotid/g Polymer (13,5 mg Nucleinsäure/g Polymer).

Beispiel 4

Die Inkubation von 200 μ l der aufgereinigten und stabilisierten Polymersuspension aus Beispiel 3 mit 76,4 ng (16,2 nmol) des Phosphorothioat-Oligodesoxynucleotids ODN-3 (MW: 4716 g/mol; Sequenz analog zu ODN-2 in Beispiel 2) ergibt ein Polymernanopartikel- Oligonucleotid-Konjugat mit einem Nucleinsäureanteil von 3,1 μ mol Oligonucleotid/g Polymer (14,6 mg Nucleinsäure/g Polymer; Bestimmung analog zu Beispiel 1).

Die Inhibition der mdr-Genexpression der Polymernanopartikel30 ODN-3-Konjugate wird mittels mRNA-Bestimmung (Northern Plot)
und mdr-Protein-Bestimmung (Western Plot) an
Rattenhepatozyten untersucht. Die PolymernanopartikelOligonucleotid-Konjugate werden in Konzentrationen von 0,032,
0,096, 0,32 und 0,96 g Polymer/l Inkubationsmedium (0,1, 0,3,
1 bzw. 3 μmol ODN-3/l Inkubationsmedium) eingesetzt. Bei
einer Konzentration von 1 μmol ODN-3/l Inkubationsmedium kann
der mRNA-Gehalt um 90 % und der Protein-Gehalt um 50 %

12

verringert werden. Mit freiem Oligonucleotid wird der gleiche Inhibitionseffekt erst bei einer Konzentration von 10 μ mol ODN-3/l Inkubationsmedium erzielt. Kontrolloligonucleotide (ODN-4; Sequenz: 5' CCT GTT GTT TTC TCT 3' bzw. ODN-5; Sequenz: 5' AAG AGC AGA CAA GAA 3') zeigen sowohl in freiem Zustand als auch in der Konjugatform mit Nanopartikeln bei den verwendeten Konzentrationen keinerlei Effekte.

10 Beispiel 5

Zur Untersuchung der Ansatzgröße der Polymerisation auf die Eigenschaften des Endproduktes wurde der Reaktionsansatz von Beispiel 3 um das Fünffache erhöht. Die Charakterisierung des aufgereinigten Materials ergab in Bezug auf Teilchengröße, Größenverteilung, Oberflächenladung und Beladungskapazität an Nucleinsäure keine nennenswerten Unterschiede zu den Ergebnissen aus Beispiel 3 (Feststoffgehalt nach der Dialyse: 23,8 mg; Partikelladung: 1 020 mC/g Polymer;
Nucleinsäureanteil: 3,4 μmol ODN-3/g Polymer bzw. 16,0 mg ODN-3/g Polymer; Bestimmung analog zu Beispiel 1).

Beispiel 6

35

Bei Inkubation von 50 μl der stabilisierten Polymersuspension aus Beispiel 3 mit 22 μg pcMVß-Plasmid gelöst in 100 μl Reinstwasser erhält man ein Polymernanopartikel-Plasmid-Konjugat mit einem Nucleinsäureanteil von 42 mg Nucleinsäure/g Polymer. Das Konjugat wird 12 bis 24 Stunden mit 2,6 μg (0,95 nmol) des Peptids Penetratin (Homeodomain-Sequenz; Mw: 2720,2 g/mol; Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., Prochiantz, A., J.Biol.Chem. 1994, 269 (14), 10444-10450) inkubiert. Die Bestimmung der Beladungskapazität von Plasmid bzw. Peptid erfolgt analog zu Beispiel 1.

13

Beispiel 7

Der Polymerisationsansatz entspricht dem in Beispiel 3, jedoch werden 2 ml Styrol eingesetzt. Das Rohprodukt besitzt einen Feststoffgehalt von 10,4 g/l und weist eine polydisperse Verteilung der Teilchendurchmesser von 50 bis 200 nm auf. Nach der Aufreinigung mittels Dialyse über einen Zeitraum von 10 Tagen beträgt der Feststoffgehalt 8,2 g/l und die Partikelladung 2190 mC/g.

PCT/EP97/05790 WO 98/17317 14

<u>Patentansprüche</u>

- 1. Verfahren zur Herstellung von biologisch aktiven Polymernanopartikel- Nucleinsäure-Konjugaten durch Polymerisation von vinylischen Monomeren mit einer 5 geringen Wasserlöslichkeit in wäßriger Lösung und anschließender Umsetzung der entstehenden Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man die Polymerisation der vinylischen Monomeren in Gegenwart von kationischen Radikalstartern 10 und in Form einer emulgatorfreien Emulsionspolymerisation durchführt.
- 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die vinylischen Monomere eine Wasserlöslichkeit von < 20 g/l 15 aufweisen.
 - 3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als vinylische Monomere Styrol, Acrylsäure-Derivate, Methacrylsäure- Derivate oder Mischungen davon eingesetzt werden.

20

- 4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man kationische Radikalstarter mit basischen Endgruppen, wie z. B. 2,2'-Azobis(2amidinopropan)di-hydrochlorid (AIBA) oder 2,2'-Azobis(2-(2-imidazolin-2-yl)propan)di-hydrochlorid (AIBI), verwendet.
- 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch 30 gekennzeichnet, daß man die Emulsionspolymerisation bei Temperaturen von 20 bis 100 °C durchführt.
- 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerteilchen nach der 35 Emulsionspolymerisation eine Teilchengröße von 10 bis 1000 nm aufweisen.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymersuspensionen vor der Umsetzung mit Nucleinsäuren bspw. durch Zentrifugation oder Diafiltration aufgereinigt werden.

5

10

20

- 8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnt, daß die Umsetzung der Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren bei Temperaturen von 10 bis 30 °C und einem pH-Wert < 11 erfolgt.
- Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nucleinsäuren Desoxyribonucleotide, Ribonucleotide oder chemisch modifizierte Desoxyribonucleotide und Ribonucleotide mit 7 bis 40 Nucleotid-Einheiten einsetzt.
 - 10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nucleinsäuren Plasmide verwendet.
- 11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß den Polymersuspensionen nach der Polymerisation Stabilisatoren in einer Menge von 0,01 bis 5 Gew.-% bezogen auf das Gewicht der Suspension zugesetzt werden.
- 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als Stabilisatoren nichtionische Block-Copolymere mit hydrophoben und hydrophilen Anteilen einsetzt.
 - 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als nichtionische Block-Copolymere Poloxamere oder Poloxamine verwendet.
 - 14. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymernanopartikel-Nucleinsäure-

Konjugate mit Peptiden, Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt > 7 oder Polyethylenimin modifiziert werden.

- 5 15. Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche.
- 16. Verwendung Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate gemäß Anspruch 15 zum Gentransfer.
 - 17. Verwendung der Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate gemäß Anspruch 15 zur Kontrolle der Genexpression.

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Integnationales Büro

TIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/17317 (51) Internationale Patentklassifikation 6: **A3** A61K 47/48. (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. April 1998 (30.04.98) PCT/EP97/05790 (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, MX, NO, US, (21) Internationales Aktenzeichen:

(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Oktober 1997 (21.10.97)

(30) Prioritätsdaten: 196 43 738.5

DE 23. Oktober 1996 (23.10.96)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SKW [DE/DE]; TROSTBERG AKTIENGESELLSCHAFT Dr.-Albert-Frank-Strasse 32, D-83308 Trostberg (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BAYER, Ernst [DE/DE]; Bei der Ochsenweide 17, D-72076 Tübingen (DE). FRITZ, Hans [DE/DE]; Ludwigstrasse 12, D-72072 Tübingen (DE). MAIER, Martin [DE/DE]; Mohlstrasse 60, D-72074 Tübingen (DE).
- (74) Anwälte: HANSEN, Bernd usw.; Hoffmann . Eitle, Arabellastrasse 4, D-81925 München (DE).

europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-6. August 1998 (06.08.98) richts:

- (54) Title: PROCESS FOR PRODUCING BIOLOGICALLY ACTIVE POLYMER NANOPARTICLE-NUCLEIC ACID CONJUGATES
- POLYMERNANOPAR-AKTIVEN BIOLOGISCH (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON TIKEL-NUCLEINSÄURE-KONJUGATEN

(57) Abstract

A process is disclosed for producing biologically active polymer nanoparticle-nucleic acid conjugates by polymerising vinyl monomers with a low water solubility in an aqueous solution, then reacting the resulting polymer suspensions with the nucleic acids. The process is characterised in that the vinyl monomers are emulsion polymerised in the presence of cationic radical starters but in the absence of any emulsifier. The thus obtained polymer nanoparticle-nucleic acid conjugates are sufficiently stable in biological media and are characterised by a high transport efficiency through cellular membranes.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Herstellung von biologisch aktiven Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugaten durch Polymerisation von vinylischen Monomeren mit einer geringen Wasserlöslichkeit in wäßriger Lösung und anschließender Umsetzung der entstehenden Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren beschrieben, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Polymerisation der vinylischen Monomeren in Gegenwart von kationischen Radikalstartern und in Form einer emulgatorfreien Emulsionspolymerisation durchführt. Die auf diese Weise hergestellten Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate weisen eine ausreichende Stabilität in biologischen Medien auf und zeichnen sich durch eine hohe Effizienz beim Transport durch zelluläre Membranen aus.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

	A The section	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AL	Albanien	FI	Spanien Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AM	Armenien			LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑT	Österreich	FR	Frankreich		_	SZ.	Swasiland
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland		-
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR.	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

inte. onal Application No PCT/EP 97/05790

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K47/48						
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classifica	tion and IPC				
	SEARCHED					
IPC 6	cumentation searched (classification system followed by classification $A61K$					
	ion searched other than minimumdocumentation to the extent that su		hed ·			
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data bas	e and, where practical, search terms used)				
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Dalawa shi a alaim hia			
Category '	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	vant passages	Relevant to claim No.			
А	SUGIYAMA, KAZUO ET AL: "Adsorpting protein on the surface of thermosymodified with the N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide and 2-(methacryloyloxy) ethyl phospholomoieties" J. POLYM. SCI., PART A: POLYM. CI (1997), 35(16), 3349-3357 CODEN: JPACEC; ISSN: 0887-624X, 1997, XP002066323 see abstract	ensitive pheres rylcholine	1-17			
Fur	ther documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed in	annex.			
"A" docum consi "E" earlier filling "L" docum which citatii "O" docum other	nategories of cited documents: nent defining the general state of the art which is not idered to be of particular relevance or document but published on or after the international date ent which may throw doubts on priority claim(s) or h is cited to establish the publicationdate of another on or other special reason (as specified) ment referring to an oral disciosure, use. exhibition or r means ment published prior to the international filing date but than the priority date claimed	T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone. Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.				
Date of the	e actual completion of theinternational search	Date of mailing of the international sear	ch report			
	28 May 1998	16/06/1998				
Name and	d mailing address of the ISA European Patent Office. P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni.	Authorized officer Berte, M				
1	Fax: (+31-70) 340-3016	1				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter onales Aktenzeichen PCT/EP 97/05790

IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES A61K47/48	• .				
Nach der Int	ernationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klass	ifikation und der IPK				
B. RECHER	RCHIERTE GEBIETE					
Recherchier IPK 6	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole A61K) 				
Recherchier	te aber nicht zum Mindestprüfstoffgehörende Veröffentlichungen. sow	ert diese unter die recherchierten Gebiete	fallen			
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	me der Datenbank und evtl. verwendete S	Suchbegriffe)			
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN					
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erlorderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.			
A	SUGIYAMA, KAZUO ET AL: "Adsorption on the surface of thermose poly(methyl methacrylate) microsplomodified with the N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide and	ensitive heres	1-17			
	2-(methacryloyloxy)ethyl phosphor moieties" J. POLYM. SCI., PART A: POLYM. CH (1997), 35(16), 3349-3357 CODEN: JPACEC;ISSN: 0887-624X, 1997, XP002066323 siehe Zusammenfassung					
Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Siehe Anhang Patentfamilie						
*Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen: "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiffelhalt erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "Ammeldung nicht kollidlert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliege nicht kollidlert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegen ist "X" Veröffentlichung on besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erf kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erf kann in ent als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung miener oder mehreren ander Veröffentlichung dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist						
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 28 Mai 1998 16/06/1998						
	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Bediensteter				
NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo ni, Fax: (+31-70) 340-3016 Berte, M						